

NF1 ~ 180mut 表达载体构建及其在脑血管细胞中的表达

梁建涛 张小燕 邹俊华 霍丽蓉

摘要 目的 前期研究中发现一合并脑血管狭窄的 I 型神经纤维瘤病家系,为探索血管狭窄的病因,本研究构建该家系患者 NF1 基因共同突变产物 NF1 ~ 180mut 的过表达质粒,观察该质粒在脑血管细胞中的表达。**方法** 设计 NF1 ~ 180mut 全长序列的相应引物,采用 pEGFP - N1 作为载体框架,构建 pEGFP - N1/NF1 ~ 180mut 表达载体,通过 Western blot 法及共聚焦检测其蛋白表达;之后采用脂质体转染重组质粒于脑血管平滑肌细胞或内皮细胞中观察 NF1 ~ 180mut 在两种脑血管细胞中的表达。**结果** ①成功构建了 NF1 ~ 180mut 表达载体;②该表达载体可在脑血管内皮细胞及平滑肌细胞内表达;③初步通过细胞计数研究及增殖实验显示 NF1 ~ 180mut 对脑血管平滑肌细胞和血管内皮细胞的生长及增殖有一定的作用。**结论** 本研究中构建了 NF1 - Q181X 突变后的产物 NF1 ~ 180mut 表达载体,为进一步深入研究 NF1 ~ 180mut 导致脑血管狭窄发生的通路提供了良好的体外研究工具。

关键词 缺血性脑卒中 狭窄 NF1 基因 血管平滑肌细胞 血管内皮细胞

中图分类号 R74

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.05.006

Construction of NF1 ~ 180mut Expression Vector and Its Expression in Cerebral Vascular Cells. Liang Jiantao, Zhang Xiaoyan, Zou Junhua, et al. Department of Neurosurgery, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China

Abstract Objective One NF1 family combined with cerebrovascular stenosis was found by us. The common feature in the NF1 patients was Q181X mutation in NF1 gene. Truncated protein (180 amino acids, NF1 ~ 180mut) was produced. To further determine the role of NF1 ~ 180mut in cerebrovascular stenosis, we constructed the recombinant pEGFP - N1/NF1 ~ 180mut plasmids and transfected cerebrovascular cells with the plasmids. **Methods** The primers of total NF1 ~ 180mut were devised. Using pEGFP - N1 as the carrier frame, we constructed the pEGFP - N1/NF1 ~ 180mut expression vector and the protein expression was detected by western - blot and confocal. Then we observed the expression of NF1 ~ 180mut in cerebrovascular smooth muscle cells or endothelial cells by liposome mediated transfection of the recombinant plasmid. **Results** (1) NF1 ~ 180mut expression vector was constructed successfully. (2) The expression vector can be expressed in brain vascular endothelial cells and smooth muscle cells. (3) The preliminary study of cell count and proliferation test showed that NF1 ~ 180mut had a certain effect on cerebrovascular smooth muscle cells and endothelial cells. **Conclusion** In this study, we constructed the expression vector of NF1 ~ 180mut from NF1 - Q181X mutation, which provides a good in vitro research tool for further study on the pathway of NF1 ~ 180mut induced cerebral vascular stenosis.

Key words Ischemic stroke; Stenosis; NF1 gene; VSMCs; VECs

NF1 基因是人类基因组中较大的基因,全长 350kb,含 60 个外显子,其转录部分的长度约 11 ~ 13kb。1987 年,该基因被定位于人类染色体 17q11.2,并于 1990 年克隆出该基因。该基因突变可

导致一种常见的常染色体显性遗传病: I 型神经纤维瘤(neurofibromatosis type I, NF1),该病在自然人群中的发生率约为 1/3500,20% ~ 60% 有家族史,发病无明显性别差异^[1]。然而近年来 NF1 基因与血管病变的关系逐渐成为血管病发病机制研究的热点之一。课题组在前期工作中发现 1 个罕见的合并脑血管狭窄的 NF1 家系,该家系 11 人为 NF1 患者,其中 4 例死于脑卒中,其余 7 例 NF1 患者均存在脑血管狭窄(通过影像学检查发现局部血管管腔内径突然变细)和脑血管走行异常,且尚未发现可引起患者血管狭窄改变的其他诱因,而家系中非 NF1 患者则血管

基金项目:国家自然科学基金资助项目(主任基金)(81341036);北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划“学科骨干”项目(2013 - 3 - 096)

作者单位:100053 北京,首都医科大学宣武医院神经外科(梁建涛);100191 北京大学医学部基础医学院细胞生物学系(张小燕),医学遗传系(邹俊华);100038 北京,首都医科大学附属复兴医院神经病学系(霍丽蓉)(梁建涛和张小燕为共同第一作者)

通讯作者:霍丽蓉,电子信箱:huolr002@163.com

发育正常。基因筛查显示家系患者的 NF1 基因存在一共同的 Q181X 无义突变,并由此产生包含 180 个氨基酸残基的截短蛋白(NF1 ~ 180mut)^[2]。从现有的文献中可知 NF1 基因产物,即肿瘤抑制因子功能的丧失是神经纤维瘤发生的重要机制,但这个家系的 NF1 患者为什么会合并脑血管狭窄?除基因突变所导致的 NF1 基因产物本身重要功能——肿瘤抑制功能的部分丧失外(杂合突变),NF1 基因突变后的产物 NF1 ~ 180mut 的产生对脑血管是否有影响?

研究初步拟通过在细胞层面来探索 NF1 ~ 180mut 单独对脑血管的影响。文中展现 NF1 ~ 180mut 表达载体的构建以及该重组质粒在脑血管内皮细胞与脑血管平滑肌细胞中的表达,并且初步观察了 NF1 ~ 180mut 对脑血管细胞生长增殖的影响。

材料与方法

1. 质粒及试剂:表达载体 pEGFP - N1(携带增强型绿色荧光蛋白基因,由本室保存。脂质体转染试剂 Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司。抗体购自 Santa Cruz 公司,其他试剂均为高质量产品。

2. NF1 ~ 180mut 扩增引物序列:NF1 - F: 5' - GGACTCAGATCTCGAGATGGCCGCGCACAGGCCGGT - 3'; NF1 - R: 5' - GGCGACCGGTGGATCCCGTAA - CAATTCTATATCATGAAC - 3';测序引物:5' - CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG - 3',从正常人 cDNA 序列常规 PCR 扩增。

3. 细胞系及细胞培养:人脑血管内皮细胞(HBMEC, PriCells, HUM - CELL - 0070)及脑血管平滑肌细胞(HBVSMC, PriCells, HUM - CELL - 0072)。培养均用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液贴壁培养,约 5 ~ 7 天传代 1 次。

4. 重组质粒转染细胞:使用威格拉斯的高效真核转染试剂:①将 HBVSMC/HBMEC 细胞放入培养皿中(100mm),汇合度 70%;②24h 后换液,DMEM 高糖,10% FBS 8ml, 37℃ 1h;③取 500μl 无血清 DMEM 培养基 + 3μl NF1 ~ 180mut 重组质粒(3.35μg/μl) + 10μlVigoFect 转染试剂混匀,室温静置 15min;④取 500μl 无血清 DMEM 培养基 + 2.5μl 对照质粒(4.034μg/μl) + 10μl VigoFect 转染试剂混匀,室温静置 15min;⑤将混合物滴入每一细胞培养皿中,来回摇动轻轻混匀,孵育细胞于 37℃ CO₂ 孵箱;⑥6h 后换液;⑦48h 爬片;⑧72h 按照制作激光共聚焦制片方法制片,用 DI-PA 染核。共聚焦显微镜观察细胞中的绿色荧光表达。

5. 细胞计数分析:脑血管平滑肌细胞/内皮细胞

转染质粒后的第 2 天开始细胞计数,接种 24 孔板,6 × 10⁴/孔,每 1 天计数 3 孔,计数取平均值,共计 7 天。制作细胞生长曲线图。

6. 细胞增殖实验(CCK - 8):按照说明书,常规 CCK - 8 细胞增殖实验分析 HBSMC 和 HBMEC 在 0、24、48h 的增殖活力。

结 果

1. NF1 ~ 180mut 表达载体构建及表达:采用 pEGFP - N1 作为载体框架,将 NF1 ~ 180mut 克隆到该载体的多克隆位点,形成重组质粒 pEGFP - N1 - NF1 ~ 180mut,经测序验证相应序列已正确插入。因 EGFP 与 NF1 ~ 180mut 形成融合基因,扩增后的重组质粒在细胞内按照阅读框架正确表达时,就会在荧光显微镜下看到绿色荧光蛋白的表达。因 293T 细胞转染效率高,图 1 显示的是将该重组质粒转染到 293T 细胞中观察蛋白表达情况,与空白对照细胞相比,转染了重组质粒的细胞中绿色荧光蛋白表达丰富。

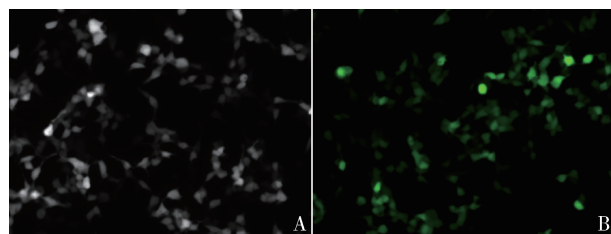


图 1 重组质粒 pEGFP - N1 - NF1 ~ 180mut 在 293T 细胞中的表达(×200)

A. 空白 293T 细胞;B. 重组质粒转染的 293T 细胞

2. NF1 ~ 180mut 在脑血管平滑肌细胞和脑血管内皮细胞中的表达:把 pEGFP - NF1 - NF1 ~ 180mut 重组质粒转染到脑血管平滑肌细胞或内皮细胞中,通过 Western blot 法检测蛋白表达,因无 NF1 ~ 180mut 的抗体,笔者采用其融合蛋白 EGFP 的抗体来检测,可间接分析到目的蛋白在脑血管平滑肌细胞或脑血管内皮细胞中的表达(图 2 中第 3 和第 5 泳道)。之

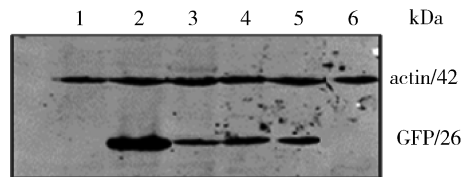


图 2 NF1 ~ 180mut 重组质粒在脑血管平滑肌细胞/内皮细胞中的表达

泳道 1 ~ 3. HBVSMC 总蛋白;泳道 4 ~ 6. HBMEC 总蛋白,42kDa 处为内参蛋白的检测,26kDa 处检测的是 EGFP 的表达。泳道 1 和 6. 细胞无质粒转染;泳道 2 和 4. 转染 pEGFP - N1 质粒;泳道 3 和 5. 转染 pEGFP - N1 - NF1 ~ 180mut 重组质粒

后,转染 24h 后通过制片,共聚焦荧光显微镜下观察,可以直观地通过 EGFP 的观察间接反应目的蛋白的表达情况(图 3)。

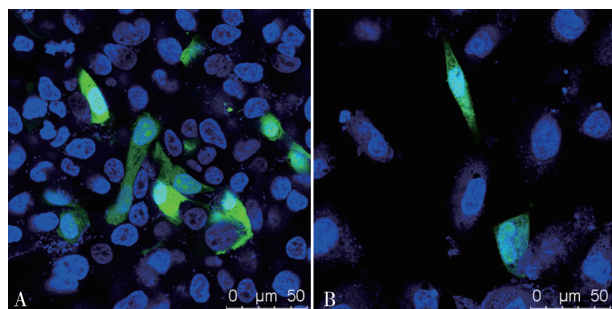


图 3 NF1~180mut 在脑血管平滑肌细胞/
内皮细胞中的表达(共聚焦)
A. HBVSMC; B. HBMEC

3. NF1~180mut 对脑血管平滑肌细胞和内皮细胞的作用:将细胞种植于 24 孔板,HBVSMC/HBMEC 转染质粒后的第 2 天开始细胞计数,方法如前

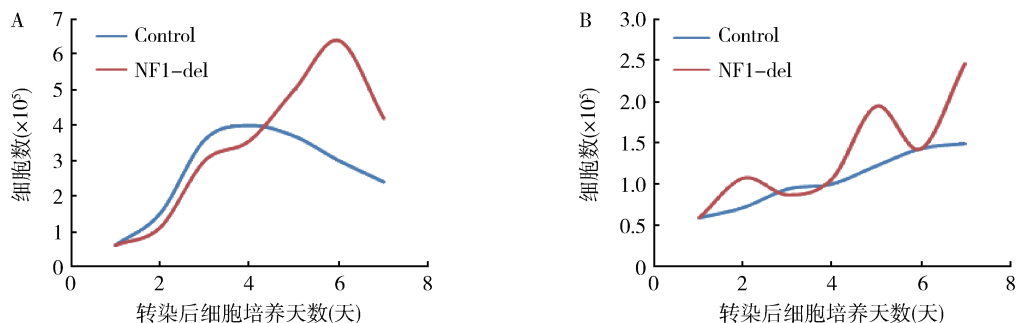


图 4 转染 NF1~180mut 重组质粒后两种脑血管细胞计数曲线图

A. HBVSMC; B. HBMEC

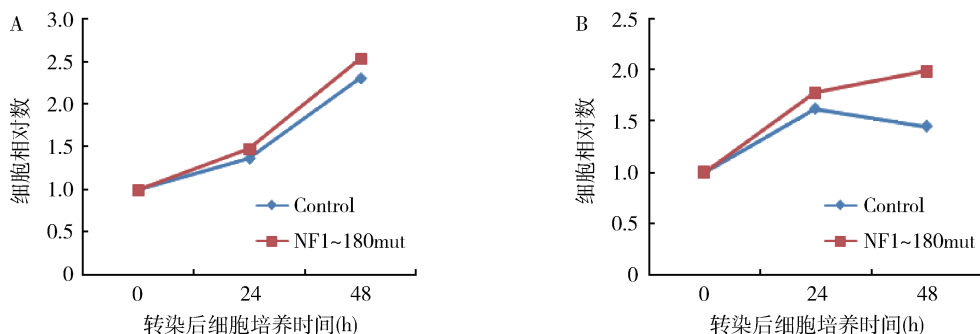


图 5 转染 NF1~180mut 重组质粒后两种脑血管细胞增殖曲线图

A. HBVSMC; B. HBMEC

讨 论

脑血管狭窄严重危害人类健康,其后果是导致高致残率、高致死率的缺血性脑卒中。脑卒中是导致死亡和残疾的主要原因,流行病学报告显示脑卒中在美

国每年影响近 80 万人,我国每年新发脑卒中患者高达 250 万人^[3,4]。但是,直接导致脑卒中发生脑血管狭窄的发病原因、发病机制,遗传背景尚不完全清楚,因此难以精准预测疾病的发展、进行相应措施的预防

和治疗。

在 2000 年以前几乎无人关注 NF1 基因与血管性疾病的关系,Ahlgren - Beckendorf 等在 1993 年对 NF1 基因与血管病变的关系进行了初步研究,他们检测到在血管上有 NF1 的表达,但没有继续深入的研究。两年后 Norton 证实了血管内皮细胞和平滑肌细胞中有 NF1 基因的产物神经纤维瘤蛋白的表达,2000 年后,研究者逐渐发现动脉壁的内在损害是 NF1 患者的重要表现,其血管病理过程可能是由于神经纤维瘤蛋白的功能改变所致^[5]。近年来,有临床病例报道 NF1 患者可伴发脑血管相关疾病,包括烟雾病、蛛网膜下腔出血、脑血管畸形等^[6-9]。对于 NF1 基因与脑血管疾病之间是否存在关联及因果关系鲜有深入研究。最近 1 项新的流行病学调查表明,NF1 患者人群与普通人群相比,脑卒中的发生率显著增高^[10]。除此之外,NF1 患者还可有多个器官系统受累,可发生肾动脉狭窄、视神经胶质瘤、脊柱侧凸、椎管内或颅内肿瘤以及结节性硬化症等^[5]。

如前述及,前期笔者发现并报道了 1 个并发脑血管狭窄的 I 型神经纤维瘤病家系,家系中 NF1 患者并发脑血管狭窄,其中已有 4 例 NF1 患者死于脑卒中,且发病年龄在 55 岁以内,对此家系进行了系谱分析及患者的 NF1 全基因筛查,发现家系中 NF1 合并脑血管狭窄的患者在 NF1 基因上的存在共同突变位点 Q181X(c.541C ~ T)^[2]。该突变发生后,可使 NF1 基因翻译到相应位点后发生终止,产生截短的 180 个氨基酸的产物 NF1 ~ 180mut,使 NF1 基因失去了编码该位置之后功能域的能力。为了进一步探索该突变是否为脑血管狭窄的独立危险因素之一,笔者先从脑血管平滑肌细胞和内皮细胞层面开始探索 NF1 ~ 180mut 对这两种细胞的影响。

首先,通过测序显示成功构建 NF1 ~ 180mut 表达载体后,通过转染 293T 细胞(图 2),Western blot 法检测结果显示,重组质粒可以成功转染并表达(图 2)。在脑血管平滑肌细胞和内皮细胞成功表达后(图 3),初步进行了细胞计数和增殖实验观察该截短蛋白对这两种细胞生长的影响。结果初步提示,该蛋白具有促进脑血管平滑肌细胞和脑血管内皮细胞生长及增殖的趋势,对脑血管平滑肌细胞的增殖影响更趋一致。后续会继续深入研究和报导该蛋白对这两

种脑血管细胞的直接影响以及模拟体内环境中的间接作用。希望能够解释在 NF1 基因不同突变发生后,除了神经纤维瘤的主要相关症状之外,为何会并发不同的疾病,为何该家系神经纤维瘤患者并发的是脑血管狭窄,而非其他的症状。这样逐步验证之前的假设,NF1 基因 Q181X 突变患者并发的脑血管狭窄是由 NF1 基因编码的产物——神经纤维瘤蛋白的功能缺失和突变后表达产物 NF1 ~ 180mut 共同所致。本研究展示了 NF1 ~ 180mut 真核表达载体的构建并初步展现转染该重组质粒对两种脑血管细胞生长增殖的影响,为进一步探索其作用机制打下了良好的基础。

参考文献

- 1 Anderson JL, Gutmann DH. Neurofibromatosis type 1 [J]. *Handb Clin Neurol*, 2015, 132: 75 - 86
- 2 Liang JT, Huo LR, Bao YH, *et al.* Cerebral vasculopathy in a Chinese family with neurofibromatosis type I mutation [J]. *Neurosci Bull*, 2013, 29 (6): 708 - 714
- 3 King S, Cuellar N. Obstructive sleep apnea as an independent stroke risk factor: a review of the evidence, Stroke Prevention Guidelines, and implications for neuroscience nursing practice [J]. *J Neurosci Nurs*, 2016, 48 (3): 133 - 142
- 4 Liu L, Wang D, Wong KS, *et al.* Stroke and stroke care in china: huge burden, significant workload, and a national priority [J]. *Stroke*, 2011, 42 (12): 3651 - 3654
- 5 梁建涛,凌锋. I 型神经纤维瘤基因突变与血管病变关系的研究进展 [J]. *中国脑血管病杂志*, 2012, 9 (3): 155 - 159
- 6 Yoo SY, Hwang SM, Lee MK, *et al.* Simultaneous presentation of malignant peripheral nerve sheath tumor and moyamoya disease associated with neurofibromatosis type 1 in a child [J]. *Turk J Pediatr*, 2015, 57 (2): 202 - 205
- 7 Patil TB, Singh MK, Lalla R. Giant malignant peripheral nerve sheath tumor with cauda equina syndrome and subarachnoid hemorrhage: Complications in a case of type 1 neurofibromatosis [J]. *J Nat Sci Biol Med*, 2015, 6 (2): 436 - 439
- 8 Rerat K, Parker F, Nasser G, *et al.* Occurrence of multiple cerebral cavernous malformations in a patient with neurofibromatosis type 1 [J]. *J Neurol Sci*, 2015, 350 (1 - 2): 98 - 100
- 9 Vargiami E, Sapountzi E, Samakovitis D, *et al.* Moyamoya syndrome and neurofibromatosis type 1 [J]. *Ital J Pediatr*, 2014, 40: 59
- 10 Terry AR, Jordan JT, Schwamm L, *et al.* Increased risk of cerebrovascular disease among patients with neurofibromatosis type 1: population - based approach [J]. *Stroke*, 2016, 47 (1): 60 - 65

(收稿日期:2016 - 10 - 08)

(修回日期:2016 - 11 - 07)